

ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С И ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

¹УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

²ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

Генотипы вируса гепатита С (HCV) и вирусной нагрузки HCV были исследованы у 54 больных хроническим гепатитом С. Не было выявлено различий в уровнях вирусной нагрузки HCV в зависимости от генотипа вируса. Вирусная нагрузка снижается при лечении альфа-интерфероном и ронколейкином. Шанс ответа на интерферонотерапию у больных с генотипом 3 HCV в 3,75 раза выше, чем у больных с генотипом 1. Согласно данным линейного регрессионного анализа, РНК HCV можно выявить в лимфоцитах периферической крови при значениях вирусной нагрузки РНК HCV в сыворотке крови, примерно превышающих 107 000 МЕ/мл.

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотип, вирусная нагрузка, хронический гепатит С

Введение

Среди инфекционных заболеваний проблема гепатита С-вирусной инфекции (HCV-инфекции) стала, особенно в последние годы, одной из самых актуальных в современной медицине. Основной процент всех хронических поражений печени приходится на HCV-инфекцию, т. е. более чем у 50-75% инфицированных HCV людей в конечном итоге, возникает хронический гепатит С (ХГС) [1]. В Республике Беларусь проживает около 100 тыс. инфицированных лиц, у большинства из которых обнаруживается ХГС [2].

Согласно принятой в настоящее время номенклатуре, выделяют, по крайней мере 6 больших групп (генотипов), внутри генотипов выделяют подтипы (их описано более 100) [1]. Генотипы HCV были пронумерованы от 1 до 6 в порядке их открытия. В Беларуси преобладают 1 и 3 генотипы HCV. Считается, что больные, инфицированные генотипом HCV 1b, имеют более тяжелое течение инфекции и хуже отвечают на лечение препаратами

α-интерферона [3]. Заражение в результате гемотрансфузий чаще происходит генотипом 1b, а генотип 3a чаще выявляется у лиц, заразившихся в результате внутривенных введений психоактивных веществ [1]. Кроме того, при ХГС, обусловленном HCV генотипа 1b, зачастую концентрация РНК HCV в крови больных выше, что также способствует неэффективности интерферонотерапии [4]. Снижение вирусной нагрузки в 100 раз и более после 12 недель терапии интерфероном (ИФН) считается хорошим прогностическим признаком ответа на лечение [5].

Для определения инфицированности, а также контроля эффективности лечения необходимо использовать метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с качественным и количественным учетом. Количество РНК HCV в биологическом субстрате (чаще всего в плазме крови) обозначается как «вирусная нагрузка», или «viral load» в англоязычной литературе.

В последние годы доказана возможность репликации HCV не только

в гепатоцитах, но и в периферических мононуклеарных клетках крови, в нейтрофилах, эритроцитах, тромбоцитах, в клетках костного мозга, селезенки и лимфатических узлов [4]. Частота выявления РНК HCV в лимфоцитах периферической крови у больных ХГС составляет 64% [6]. По данным ряда исследователей, репликация вируса возрастает по мере прогрессирования болезни [7], и более высокий уровень вирусии коррелирует с более серьезным повреждением печени [8]. РНК HCV в мононуклеарных клетках периферической крови (МПК) не всегда определяется при наличии HCV вирусии, ее содержание напрямую зависит от концентрации HCV в плазме крови [9]. Инкубация МПК здоровых доноров в течение 2 часов в среде, содержащей РНК HCV в различных концентрациях, приводила к дозозависимому накоплению РНК HCV внутри клеток крови, что можно объяснить в том числе и пассивной абсорбцией вируса или контаминацией клеток крови [9]. У пациентов с выявляемой минус-цепью РНК HCV в МПК стойкий ответ на интерферонотерапию был значительно ниже [10].

Данные о роли генотипа вируса и вирусной нагрузки в патогенезе инфекции противоречивы. Необходимы дальнейшие исследования по изучению свойств вируса для разработки эффективных средств профилактики и специфических препаратов для лечения ХГС, что позволит контролировать это распространенное заболевание.

Цель исследования: изучить частоту встречаемости различных генотипов HCV у больных ХГС, их взаимосвязь с уровнем вирусной нагрузки, оценить изменения уровней вирусной нагрузки и роль генотипа HCV при терапии α -интерфероном и ронколейкином, а также оценить уровни РНК вируса гепатита С в крови и лимфоцитах у больных ХГС.

Материалы и методы исследования

Обследовано 54 больных ХГС, находившихся на лечении в Гомельской

областной инфекционной клинической больнице. Среди обследованных больных – 31 мужчина (57,4%) и 23 женщины (42,6%). Возраст больных колебался от 10 до 75 лет, средний возраст $34,8 \pm 2,1$ года. У 10 больных ХГС был в стадии цирроза печени. Генотип HCV определялся методом ПЦР с помощью тест-систем фирмы «АмплиСенс HCV генотип». Вирусная нагрузка определялась методом Real-Time ПЦР с использованием тест-систем «АмплиСенс HCV-МОНИТОР-FRT» на 4-х канальном приборе RotorGene 3000 фирмы Corbett Research (Австралия). Лимфоциты периферической крови для анализа вирусной нагрузки выделялись с помощью градиента плотности фиколл-верографина.

Статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном компьютере с помощью программ STATISTICA v.6.0 и Microsoft Excel 2002. При оценке нормальности распределения значений вирусной нагрузки по критерию Колмогорова-Смирнова получены значения $K-S d = 0,308$, $p < 0,01$. Таким образом, данные не соответствуют нормальному распределению, поэтому использовались непараметрические критерии: критерий Манна-Уитни для сравнения в независимых группах, критерий Вилкоксона для сравнения в зависимых группах, точный критерий Фишера для сравнения частот в квадратах 2×2 . Также применялся линейный регрессионный анализ, вычислялось отношение шансов.

Результаты исследования

Проанализирована встречаемость различных генотипов HCV у 54 больных ХГС, из них генотип 1 выявлен у 39 (72,2%), 3 – у 13 (24,1%), 2 – у 1 (1,9%), два генотипа 1+3 – у 1 (1,9%). Среди 39 лиц с генотипом 1 мужчин и женщин было почти поровну, 20 и 19 больных соответственно (51,3% и 48,7%). Среди 13 больных с генотипом 3 преобладали мужчины – 9 чел. (69,2%). При сравнении частот с помощью точного критерия Фишера не выявлено

значимых различий по полу в зависимости от генотипа HCV ($p = 0,21$).

Известно, что до начала 90-х годов наиболее часто инфицирование происходило генотипом 1 HCV, поэтому можно предположить, что среди лиц с 1 генотипом будут преобладать пациенты более старшего возраста. Нами сравнивался возраст больных ХГС в зависимости от генотипа: 1 (40 чел.) или не 1 (14 чел.) с помощью непараметрического теста Манна-Уитни. Медиана возраста у лиц с 1 генотипом HCV составила 31 год, а у лиц с генотипами 2 и 3 – 39 лет. Значимых различий не выявлено ($p = 0,333$). В настоящее время генотип 1 распространяется и среди молодых лиц.

Далее оценивалось количество РНК HCV в сыворотке крови 54 больных ХГС. Значения вирусной нагрузки колебались от 8192 МЕ/мл до 52 172 889 МЕ/мл (медиана 263 104 МЕ/мл, интерквартильный размах – от 111 102 до 1 524 838 МЕ/мл). У 12 человек уровень вирусной нагрузки был менее 100 000 МЕ/мл (22,2%), у 20 – в пределах 100 000-500 000 МЕ/мл (37,0%), у 22 – более 500 000 МЕ/мл (40,7%). У 17 человек (31,5%) вирусная нагрузка была выше 1 000 000 МЕ/мл. Среди лиц с высокой вирусной нагрузкой было 13 мужчин и 4 женщины в возрасте от 24 до 56 лет; 11 лиц с генотипом 1; 1 – с генотипом 2 и 5 – с генотипом 3.

Проанализированы значения вирусной нагрузки в зависимости от генотипа HCV с помощью критерия Манна-Уитни. У лиц с 1 генотипом медиана вирусной нагрузки составила 213 206 МЕ/мл, у лиц со 2 и 3 генотипами – 729 280 МЕ/мл. Статистически значимых различий уровней вирусной нагрузки в зависимости от генотипа HCV не выявлено ($p = 0,093$).

Определялась вирусная нагрузка (ВН) РНК HCV в сыворотке крови (СК) и лимфоцитах периферической крови (ЛПК) тех же пациентов. Проведено 10 исследований, ВН РНК HCV в ЛПК сравнивалась с ВН в СК. В 5 случаях при низких значениях вирусной нагрузки в СК (144 679 МЕ/мл и менее) выявить РНК HCV в ЛПК не уда-

ется, при больших значениях ВН в сыворотке крови выявляется РНК HCV в ЛПК, но в более низких концентрациях. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты сравнения вирусной нагрузки (ВН) РНК HCV в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) и сыворотке крови (СК)

№	Пациент, пол, возраст	Генотип HCV	ВН в СК, МЕ/мл	ВН в ЛПК, МЕ/мл
1	Г., жен., 42 года	1b	28 542	0
2	М., жен., 59 лет	1b	59 259	0
3	Ф., жен., 28 лет	3a	69 648	0
4	Х., жен., 60 лет	1b	120 684	0
5	К., жен., 31 год	1b	144 679	0
6	Н., муж., 50 лет	1b	72 924	850
7	Г., жен., 38 лет	1b	91 698	1 333
8	П., жен., 32 года	1b	172 048	221
9	Щ., жен., 35 лет	1b	214 620	373
10	Ч., муж., 56 лет	3a	762 268	72 795

Вирусная нагрузка в лимфоцитах периферической крови ниже, чем в сыворотке крови, и возрастает с увеличением последней. Для более точного анализа полученных данных проведен линейный регрессионный анализ между ВН РНК HCV в ЛПК и СК. Негативные значения определения ВН в ЛПК соответствуют показателям, не превышающим порог чувствительности тест-системы (200 МЕ/мл). Поэтому негативные значения были заменены случайно сгенерированными числами в диапазоне от 0 до 200. Выявлено, что зависимость ВН HCV в ЛПК от ВН РНК HCV в сыворотке крови описывается уравнением:

$$\text{ВН РНК HCV в СК} = 9,0238 \times \text{ВН РНК HCV в ЛПК} + 105151$$

Коэффициент аппроксимации составил $R^2 = 0,9303$. Таким образом, положи-

тельные значения определения ВН РНК HCV в ЛПК следует ожидать в случае, если ВН РНК HCV превышает порог, примерно равный 105 151 МЕ/мл. Согласно уравнению, если ВН в ЛПК будет принимать значения от 0 до 200 МЕ/мл (негативный результат в ПЦР), то ВН в СК будет колебаться в диапазоне от 105 151 до 106 956 МЕ/мл. Необходимо увеличить количество наблюдений для более точного построения линейной регрессионной модели.

Оценивалось количество РНК HCV у 51 больного ХГС до назначения специфического лечения. Значения вирусной нагрузки колебались от 759 МЕ/мл до 30 948 625 МЕ/мл. Медиана вирусной нагрузки составила 252 926 МЕ/мл, интерквартильный размах от 100 776 до 1 150 864 МЕ/мл.

В процессе терапии обследовались 38 пациентов, которые получали терапию интерфероном и 13 – получивших лечение рекомбинантным интерлейкином-2 (ронколейкин).

До начала лечения интерфероном уровни вирусной нагрузки составляли от 10 813 МЕ/мл до 30 948 625 МЕ/мл, медиана – 252 926 МЕ/мл. В процессе лечения уровни РНК HCV были ниже: от неопределяемого уровня до 7 026 118 МЕ/мл, медиана – 9 386 МЕ/мл (по критерию Манна-Уитни $p = 0,004$). Мы сравнили вирусную нагрузку в динамике у одних и тех же 26 пациентов через 1-3 месяца от начала терапии. У 14 из них (53,8%) значения РНК HCV в ПЦР снижались более чем в 100 раз или были ниже порога чувствительности, у 4 (15,4%) уровни РНК HCV снижались, но впоследствии вновь повышались, у 8 (30,8%) пациентов снижения уровней РНК HCV не происходило, что свидетельствовало о неэффективности терапии. С помощью критерия Вилкоксона выявлено статистически значимое снижение уровней РНК HCV через 1-3 мес. интерферонотерапии ($p = 0,009$).

Из 26 пациентов 14 (53,8%) ответили на терапию (снижение ВН более чем в 100 раз либо до неопределяемого уровня). У 18 пациентов был 1 генотип HCV, у 8 пациентов – 3 генотип. Из 18 паци-

ентов с генотипом 1 ответ на терапию был у 8, неответ – у 10. У 6 из 8 пациентов с генотипом 3 зарегистрирован ответ на лечение. Для прогнозирования вероятности ответа на терапию в зависимости от генотипа HCV нами использовано отношение шансов (ОШ). Шанс ответа у больных с 1 генотипом равен 0,8; шанс ответа у больных с 3 генотипом равен 3. $ОШ = 3/0,8 = 3,75$ (95% доверительный интервал 0,59 – 23,87). Таким образом, шанс ответа у больных с 3 генотипом HCV в 3,75 раза выше, чем у больных с генотипом 1.

Нами определялись уровни вирусной нагрузки у 13 больных ХГС, получавших ронколейкин. До начала терапии медиана вирусной нагрузки у них составила 871 598 МЕ/мл, после курса лечения – 125 649 МЕ/мл. Всего из 13 больных после курса у 3 человек вирусная нагрузка осталась такой же или повысилась (23,1%), у 10 – титры РНК HCV снижались (76,9%), причем у 2 из них стали ниже порога чувствительности ПЦР (отрицательные результаты, 15,4%). С помощью критерия Вилкоксона установлено, что в динамике терапии у одних и тех же лиц происходит снижение вирусной нагрузки ($p = 0,027$). Учитывая, что лечение ронколейкином значительно дешевле, чем лечение интерфероном и не имеет столь выраженных побочных реакций, можно считать его применимым для лечения больных ХГС.

Заключение

В результате исследования установлено, что среди обследованных больных преобладали генотипы 1 HCV (72,2%) и генотип 3 (24,1%), причем генотип 1 HCV в настоящее время распространяется и среди молодых лиц. Значения вирусной нагрузки у больных ХГС колебались в широком пределе: от 8 192 МЕ/мл до 52 172 889 МЕ/мл (медиана 263 104 МЕ/мл, интерквартильный размах от 111 102 до 1 524 838 МЕ/мл). Нами не подтверждаются данные о более высокой вирусной нагрузке у больных с 1 генотипом HCV, напротив, медиана вирусной нагрузки была

выше у больных с 3 генотипом вируса, однако различия не были статистически значимы ($p = 0,093$). Согласно данным линейного регрессионного анализа, РНК HCV можно выявить в лимфоцитах периферической крови при значениях вирусной нагрузки РНК HCV в сыворотке крови, примерно превышающих 107 000 МЕ/мл. Необходимо увеличить количество наблюдений для более точного построения линейной регрессионной модели.

Наши данные подтверждают тот факт, что в процессе лечения препаратами интерферона уровни РНК HCV снижаются ($p < 0,01$). Шанс ответа на интерферонотерапию у больных с 3 генотипом HCV в 3,75 раза выше, чем у больных с генотипом 1. При лечении ронколейкином происходило снижение количества РНК HCV ($p = 0,027$), у 76,9% уровни вирусной нагрузки снижались, причем у 15,4% – стали ниже порога чувствительности ПЦР.

Библиографический список

1. Шахгильдян, И. В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / И. В. Шахгильдян, М. И. Михайлов, Г. Г. Онищенко. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ. – 2003. – 384 с.

2. Система диагностики диффузных паренхиматозных поражений печени у различных групп населения с повышенным риском инфицирования вирусными гепатитами В, С, D, G: Методические рекомендации. / С. В. Жаворонок [и др.]. – Минск, 1998. – 52 с.

3. Лечение вирусных гепатитов / А. А. Ключарева [и др.]; Под ред. А. А. Ключаревой. – Минск: ООО «ДокторДизайн». – 2003. – 216 с.

4. Хронический вирусный гепатит / Под ред. В. В. Серова, З. Г. Апросиной. – М.: Медицина, 2002. – 384 с.

5. Гепатит С: консенсус 2002. / Национальный институт здоровья (США) // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. Инф. бюл. – 2002. – № 2. – С. 3-11.

6. Лакина, Е. И. РНК вируса гепатита С в организме больных хроническим гепатитом С / Е. И. Лакина, А. А. Куш // Вопросы вирусологии. – 2002. – № 2. – С. 4-11.

7. *In situ* detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue using a digoxigenin-labeled probe created during a polymerase chain reaction / S. W. Cho [et al.] // J. Med. Virol. – 1996. – V. 48, N 3. – P. 327-333.

8. Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: high-titer viremia correlates with advanced stage of disease / D. Gretch [et al.] // J. Infect. Dis. – 1994. – V.169. – P.1219-1225.

9. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? / V. Meier [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 7, N 2. – P. 228-234.

10. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy / G. Z. Gong [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9, N 2. – P. 291-294.

The genotypes of hepatitis C virus (HCV) and HCV viral load were studied in 54 patients with chronic hepatitis C. There were not detected any differences in the levels of HCV viral load depending on virus genotype. Viral load decreases during treatment by alpha interferon and roncicleikin. Response chance on interferontherapy is 3,75 times higher in patients with genotype 3 of HCV than in patients with genotype 1. According to data of linear regression analysis, HCV RNA can be detected in lymphocytes of peripheral blood in patients with values of viral load of HCV RNA in blood serum approximately exceeding 107 000 ME/ml.

Keywords: hepatitis C virus, genotype, viral load, chronic hepatitis C

Поступила 01.09.09